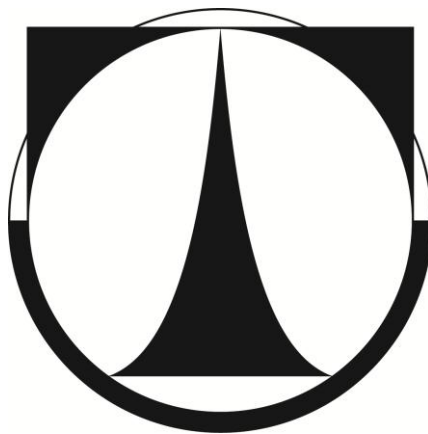


**TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ**



**BIOLOGICKÉ ÚČINKY RÁZOVÉ VLNY NA
MODELOVÉ SYSTÉMY IN VITRO**

The biologic effects of shock wave on model systems in vitro

Bakalářská práce

Studijní program: B 3944 Biomedicínská technika

Studijní obor: 3901R032 Biomedicínská technika

Vedoucí bakalářské práce: prof. MUDr., RNDr. Jiří Beneš CSc.

Rozsah práce: Počet stran textu.....50

Počet obrázků.....12

Počet tabulek.....6

Počet grafů.....6

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Soňa KLEPSOVÁ**
Osobní číslo: **Z08000003**
Studijní program: **B3944 Biomedicínská technika**
Studijní obor: **Biomedicínská technika**
Název tématu: **Biologické účinky rázové vlny na modelové systémy in vitro**
Zadávající katedra: **Ústav zdravotnických studií**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Cílem této práce je zjistit, jaké jsou biologické účinky rázových vln na tkáň, modelovým systémem in vitro bude připravená suspenze ředěných erytrocytů fyziologickým roztokem, jež bude následně exponována.

Výzkum vzájemné interakce dvou po sobě následujících rázových vln fokusovaných do společného ohniska, kdy první rázová (tlaková) vlna vytvoří v původně akusticky homogenním prostředí akustickou nehomogenitu, na které se pak bude druhá vlna silně tlumit a akustická nehomogenita umožní disipaci akustické energie s následnou tvorbou kavitací. Nehomogenita vytvářená první vlnou bude pouze v okolí ohniska s tím, že účinky druhé vlny budou lokalizovány právě v této oblasti. Kolabující kavitace vytvářené druhou vlnou generují sekundární, velmi krátkovlnné rázové vlny, které mohou interagovat se strukturami buněčných rozměrů.

Cílem sledování je zjištění optimální fyzikální konfigurace, jako jsou vlastnosti a průběh první či druhé rázové vlny a především zpoždění těchto tlaků, které vykazuje největší změny. Kromě sledování hemolýzy červených krvinek, bude řada pokusů realizována na nádorových buněčných liniích, čímž se budeme více přibližovat konečné možnosti využití rázové vlny, a to aplikací rázových vln za účelem destrukce tkání zhoubných nádorů či jiných chorobných ložisek.

Pracovišti budou IV. interní klinika VFN 1. LF UKV a ÚFP AV ČR. Výsledky budou řádně zpracovány.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce:

Seznam odborné literatury:

50-70 stran

tištěná/elektronická

viz příloha

Vedoucí bakalářské práce:

prof. MUDr. RNDr. Jiří Beneš, CSc.


Ústav zdravotnických studií

Datum zadání bakalářské práce:

30. dubna 2010

Termín odevzdání bakalářské práce:

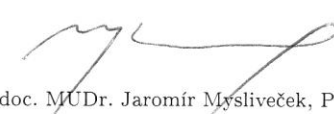
30. dubna 2011


prof. Dr. Ing. Zdeněk Kůs

rektor

L.S.




doc. MUDr. Jaromír Mysliveček, Ph.D.

ředitel

V Liberci dne 30. listopadu 2010

Příloha zadání bakalářské práce

Seznam odborné literatury:

- [1] Seemann, J. Rassweiler, M. Chvapil, P. Alken, G.W. Drach: "Effect of low dose shock wave energy on fracture healing an experimental study"q, J. Endourology, vol. 6, pp.219-223, June1992
- [2] Kan-Ei Lee, P. Smith, A.T.K. Cockett: "Influence of high-energy shock waves and cisplantin on antitumor effect in murine bladder cancer" q, Urology vol. XXXVI, pp. 440-44, Nov. 1990
- [3] E.B Cornel, G. Smits, F.M.J Debruyne, A. Heerschap, J.A. Schalken, G.O.N Oosterhof:
The Effects of successive high-energy shock-wave tumor administration on tumor blood- flow, Ultrasound in Med.& Biol. 21, (2) 243-248 1995
- [4]: P. Šunka, V. Babický, M. Člupek, K. Neufuss, J. Beneš: Způsob generace fokusované rázové vlny elektrickým výbojem v kapalině a zařízení k provádění tohoto způsobu, Patent č. 291158, udělen 30. 10. 2002
- [5] P. Šunka: "Pulse electrical discharges in water and their applications"q, Phys. of Plasmas, vol. 8, pp. 2587-2594, May 2001
- [6] P. Šunka, M. Fuciman, V. Babický, M. ,
Člupek, J. Beneš, P. Poučková, J. Souček: Generation of focused shock waves by multi-channel electrical discharges in water, Czech. J. Phys., Vol. 52 (2002), Suppl. D, D397-D405, Invited Paper
- [7] P. Šunka, M. Fuciman, V. Babický, M. Člupek, J. Beneš, P. Poučková, J. Souček: Generation of focused shock waves by multichannel electrical discharges in water, Conference record of the 25th Int. Power Modulator Symp., Hollywood, June 30-July 3, 2002, edit: H. Kirbie and D. Goehel, IEEE catalog No. 02CH37281, p.174 (oral presentation)
- [8] P. Šunka, V. Babický, M. Člupek, M. Fuciman, P. Lukeš, M. Šimek, J. Beneš, Z. Majcherová: Potential applications of pulse electrical discharges in water, Invited paper on SAPP, Slovakia, submitted for publication in Acta Physica Slovaca

Prohlášení

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím bakalářské práce a konzultantem.

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. o právu autorském, zejména § 60 (školní dílo).

Beru na vědomí, že TUL má právo na uzavření licenční smlouvy o užití mé bakalářské práce a prohlašuji, že **s o u h l a s í m** s případným užitím mé bakalářské práce (prodej, zapůjčení apod.).

Jsem si vědoma toho, že užít své bakalářské práce či poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem TUL, která má právo ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, vynaložených univerzitou na vytvoření díla (až do jejich skutečné výše).

V Liberci dne 27.4.2011

.....
Podpis

Poděkování

Děkuji vedoucímu své bakalářské práce prof. MUDr., RNDr. Jiřímu Benešovi, CSc. za odborné vedení. Rovněž Mgr. Lukášovi Dibdiakovi za čas, který mně a mé práci věnoval. Zvláštní dík patří panu doc. Pavlu Šunkovi, CSc. z Ústavu fyziky plazmatu AV ČR, jehož aktivní zájem o řešenou problematiku přinesl mnoho, doc. RNDr. Pavle Poučkové, CSc. a RNDr. Marii Zadinové z oddělení experimentální radiobiologie Ústavu biofyziky a informatiky za neodmyslitelnou pomoc s přípravou a zpracováním experimentů.

Anotace

Tato práce se zabývá analýzou účinků rázových vln na biologickou tkáň. Interakce těchto vln na buněčné úrovni je již známa. Za účelem většiny experimentů byla připravena suspenze lidské krve in vitro ředěná fyziologickým roztokem ve stanoveném poměru. Systém byl exponován jednoduchými a interagujícími vlnami, jejichž principu a generování se věnuje teoretická část práce. Ve výsledcích je uvedena míra hemolýzy krve při změně počtu rázů, změně napětí zdroje a vliv umístění vzorku. Hodnocen je též efekt rázování na životnost lymfocytů a v neposlední řadě výsledky experimentu s nádorovými buňkami linie K-562, které by perspektivně měly vést možnosti aplikace rázových vln za účelem destrukce nádorových tkání.

Klíčová slova: rázová vlna, interakce, erytrocyty, hemolýza

Annotation

This work deals with the analysis of shock waves' effect on biological tissue. The interaction between these waves and the cells is already known. For purpose there was prepared the suspension of human blood in vitro with saline solution at a specified rate. The system was exposed by simple and tandem waves. The principle and the generation is dedicated in the theoretical part. The results indicated the degree of hemolysis of blood according to change the number of shocks, the voltage of source and the influence of the spacement. Also evaluated the effect on the life of lymphocytes and finally there are the results of experiments with tumor cell line K-562 which should show the possibility of application the shock waves for destruction the tumor tissue.

Key words: shock wave, interaction, erythrocytes, hem

Obsah

TEORETICKÁ ČÁST.....	9
Úvod.....	10
1 Vývoj rázové vlny.....	11
1.1 Historie ve světě.....	11
1.2 Historie v České republice.....	13
1.3 Současné uplatnění v medicíně.....	15
2 Charakteristika rázové vlny.....	17
2.1 Zdroje rázových vln.....	20
2.1.1 Elektrohydraulický zdroj.....	20
2.1.2 Piezoelektrický generátor.....	21
2.1.3 Elektromagnetický generátor.....	22
2.2 Princip experimentálního generátoru.....	23
3 Krev.....	26
3.1 Fyziologie krve.....	26
3.1.1 Erytrocyty.....	28
3.1.2 Hemoglobin a hemolýza.....	29
3.2 Rázová vlna a účinky na složky krve.....	33
4 Cíle.....	34
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	35
5 Metodika a materiál.....	36
5.1 Příprava materiálu.....	36
5.2 Exponování materiálu.....	37
5.3 Stanovení uvolněného hemoglobinu.....	38
6 Výsledky.....	39
7 Diskuze.....	45
Závěr.....	47
Seznam použité literatury.....	48
Seznam použitých obrázků.....	50

TEORETICKÁ ČÁST

Úvod

Více než čtvrt století jsou publikovány výsledky léčby a odstraňování ledvinových či močových kamenů pomocí aplikace rázové vlny, což vedlo k úvahám o jejich využití i v jiných oblastech. Medicína je obor nekonečných možností. Žádoucí je eliminace komplikací, ať operačních či pooperačních, komfort pacienta a v neposlední řadě neinvazivní zásah do tolik zranitelného systému, jakým lidský organismus je. Důkazem je ortopedie, v níž je vynakládáno úsilí do výzkumu použití rázové vlny při reoperacích kyčelních náhrad. Pohnutkou pro tuto práci byla však, již dříve objevená, interakce rázové vlny s buněčnými strukturami.

Za tímto účelem byl vytvořen nový generátor na pracovišti Akademie věd České republiky, v Praze, Ládví. Jeho princip se liší od všech předchozích zdrojů, založen je na mnohokanálovém výboji vznikajícím na kompozitní anodě. V praxi jde o generování dvou po sobě jdoucích jednoduchých rázových vln fokusované do společného ohniska. První vlna vytvoří v prostředí akustickou nehomogenitu, s níž bude druhá zpožděná vlna silně interagovat. Cílem výzkumu je sledování optimální konfigurace generátoru vykazující rozdílné vlastnosti první a druhé vlny, vyřešení umístění exponovaného systému a především zpoždění jednotlivých výbojů, které je příčinou největší změny.

Nejen sledováním hemolýzy červených krvinek jsme se přesvědčili o interakci rázových vln na buněčné úrovni, důkazem jsou i rázováním usmrčené lymfocyty. Účinkům byla vystavena i nádorová buněčná linie, což je předmětem snahy se více přibližovat konečné možnosti využití rázové vlny, a to aplikaci za účelem destrukce tkání zhoubných nádorů či jiných chorobných ložisek.

Nádorová tkáň má ale, na rozdíl od litiáz, stejnou akustickou impedanci jako měkké tkáně. Nabízí se však využití vznikajících kavitací a interagujících, tedy dvou po sobě jdoucích jednoduchých, rázových vln k vyvolání poškození.

Hlavními zázemími pro projekt se stala IV. interní klinika VFN 1. LF UKV a Ústav fyziky plazmatu Akademie ČR, kde celý průběh značně zjednodušila výstavba nové chemické laboratoře na špičkové úrovni.

1 Vývoj rázové vlny

1.1 Historie ve světě

Nejen v oblasti medicíny zažívá technika na celém světě obrovský rozmach a nové technologie přináší stále sofistikovanější diagnostické i terapeutické přístroje. Není tomu jinak ani v případě diagnostiky využívající ultrazvuk, tedy ultrasonografie a terapeutických aplikací ultrazvuku, které za posledních 50 let prošly prudkým technickým vývojem. Dnešní ultrasonografická zařízení umožňují provádět nejen běžná morfologická a funkční vyšetření, vedle toho i invazivní zákroky diagnostického či terapeutického charakteru. Desintegrace a odstraňování ledvinových a žlučových konkrementů přístrojem zvaným litotryptor je jedna z, dnes už rutinních, aplikací ultrazvuku. Od prvního praktického použití přitom neuběhla příliš dlouhá doba. První poznatky pochází z let druhé světové války. Tehdy byly pozorovány narušené plíce trosečníků bez vnějších známek násilí, a to vlivem exploze vodních výbušnin [1, 2].

Jak už bylo řečeno – metoda léčby rázovou vlnou (anglicky Extracorporeal Shock Wave Therapy, dále jen ESWT, německy Stosswellentherapie) nemá dlouhou historii. Fyzikální vlastnosti elektromagneticky generovaných rázových vln byly popsány na konci padesátých let, kdy byl veden první systematický výzkum. První začátky a experimenty s účinky rázové vlny v medicíně v těchto letech minulého století pochází z USA, kde vznikl i první patent na elektrohydraulický generátor rázových vln, který byl schopen rozbít ve vodě keramické desky.

Významnými milníky byly konec šedesátých a začátek sedmdesátých let minulého století (mezi roky 1968 až 1971). V této době se v Německu zabývali účinky rázové vlny na biologické tkáně, tkáně zvířat. Program byl financován německým Ministerstvem obrany. Odtud pochází fakt, že rázové vlny s vysokou energií mají vliv na organismus i přes velké vzdálenosti. Zaměřili se na zkoumání vlivů rozhraní v organismu společně s rozdílem a útlumem rázové vlny při její dráze živou tkání. Což přineslo další významné poznatky. Vystává zde uvažování mírných vedlejších účinků

na svaly, tukovou a pojivovou tkáň, přičemž kostní tkáň zůstává nepoškozena. V neposlední řadě se věnovali otázce hrozícího nebezpečí plicím, mozku a jiným orgánům nejen v dutině břišní. Výsledkem byl hodnotný závěr, že nejlepšími médii pro přenos rázových vln jsou voda a želatina, protože mají podobné akustické vlastnosti jako tkáň. To je důvod, proč rázová vlna prochází měkkými tkáněmi takřka bez jejich poškození.

Toto všechno evokovalo myšlenku a snahu rozbít ledvinové kameny pomocí extrakorporálně generovaných rázových vln. Realizace z hlediska technického a medicínského nebyla zpočátku jasná. Existovala zde již však idea. V roce 1971 Haeusler a Kiefer publikovali první účinky rázové vlny na rozbíjení ledvinových kamenů v laboratoři (in vitro) pomocí rázových vln bez přímého kontaktu s kamenem. Následovali další in vitro pokusy bezkontaktního rozbíjení konkrementů.

V roce 1974 začalo německé Ministerstvo pro vědu a výzkum financovat program pojmenovaný „Aplikace ESWL“. Členy výzkumného týmu byli např. Eisenberger, Chaussy, Brendel, Forssmann a Hepp. V roce 1976 firma Dornier vyvíjela prototyp litotryptoru, který byl úspěšně zkoušen na psech s voperovanými lidskými konkrementy. Rok 1980 je z pohledu litotrypse velmi významným. Právě v tomto roce byl v Mnichově, prototypovým přístrojem nazvaným Dornierův litotryptor HM1, léčen první pacient s ledvinovými kameny. Použití tohoto modelu bylo velmi omezeno, neboť kritéria byla velmi přísná – pacient musel mít absolutně volné močové cesty, konkrement musel být vskutku malých rozměrů a vyloučen by byl blokuující konkrement v pánvičce. Druhý model HM2 pracoval s 90% úspěšností. První komerční litotryptor (HM3) byl instalován ve Stuttgartu v roce 1983. Model HM3 je považován za zlatý standard s vynikajícími parametry, a proto byl v roce 1984 schválen k použití nejen v Evropě, ale i v Japonsku a USA.

Z litotrypse rázovými vlnami se stala rutinní léčebná metoda ledvinových konkrementů. Přitom možnosti využití a léčebných zásahů rázové vlny do organismu byly objeveny absurdní náhodou. V roce 1966 v mnichovských laboratořích firmy Dornier vyrábějící nadzvukové letouny byl model křídla ostřelován urychlenými vodními projektily. Během experimentů se zaměstnanec dotkl plochy křídla právě

v momentu, kdy byla ostřelována, načež si stěžoval na zasažení elektrickým proudem. Ukázalo se, že nešlo o elektrický proud, nýbrž o rázovou vlnu, která pronikla tělem zaměstnance [3, 4, 5].

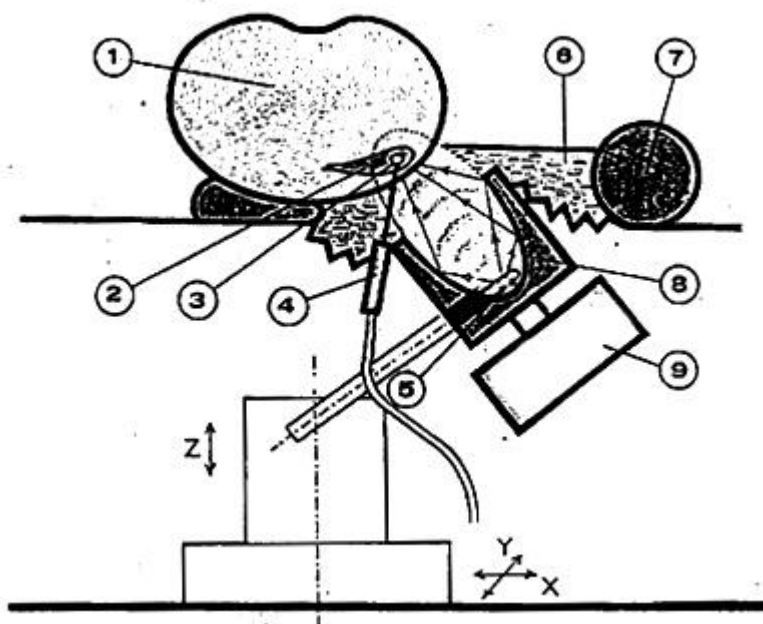
Ve snaze o rozbití tentokrát žlučových kamenů za pomoci extrakorporálně generovaných rázových vln následovala celá řada in vivo a in vitro pokusů. V roce 1985 byla v Mnichově provedena první léčba žlučových kamenů pomocí ESWL. O rok později byl v Mainzu testován prototyp litotryptoru bez vodní lázně. Dnes je léčba ledvinových a močových konkrementů pomocí extrakorporálně vygenerovaných rázových vln rutinní záležitostí a léčbou tzv. první volby. Všechny moderní litotryptory pracují již bez vodní lázně a bez anestézie. Za posledních 15 let bylo již touto metodou léčeno více jak 3 milióny pacientů [5].

1.2 Historie v České republice

Těž v Praze probíhal v těchto letech vývoj litotryptoru. Začátkem 80. let byly ve výzkumné laboratoři při 1. interní klinice 1. LF UK v Praze studovány možnosti odstraňování žlučových konkrementů jejich rozpouštěním pomocí žlučových kyselin. Ovšem pokusy s rozpouštěním větších konkrementů (o průměrech větších než 10 mm) nebyly úspěšné a tehdy vznikla myšlenka větší konkrementy nejdříve rozbít ultrazvukovým vlněním a teprve pak je rozpouštět. Počáteční pokusy s ultrazvukovým periodickým vlněním k dezintegraci konkrementů nepřinesly očekávané výsledky, neboť pokusy o fokusaci ultrazvukových vln narážejí na fyzikální omezení dané vlnovou délkou, absorpcí a prahem kavitací. S rostoucí frekvencí roste i absorpce ultrazvukové energie ve tkáních a narůstá i práh, při kterém dochází ke kavitačním jevům a tedy k nežádoucím účinkům.

V roce 1984 byly využity výsledky publikované v Německu. Rázová vlna tehdy byla novým pojmem a revoluční metodou k rozrušování a odstraňování ledvinových konkrementů neinvazivním způsobem. Ústav fyziky plazmatu (ÚFP) Akademie věd (AV) ČR je jedním z průkopníků této revoluční metody, kde byly navrženy originální litotryptory s jiskrovým výbojem a jsou používány v rutinní klinické praxi v mnoha

českých nemocnicích. Odborníci z ÚFP AV měli mnohaleté zkušenosti s rázovými vlnami, které představovaly doprovodný jev při generování silných elektronových svazků. V roce 1986 se zde podařilo úspěšně vyrobit první experimentální zdroj rázových vln k rozrušování konkrementů ve vodě [6, 7]. Zároveň byly zkoumány účinky rázové vlny na biologické tkáně u krys a prasat [8]. Současně probíhaly úspěšné pokusy na prasatech s voperovanými lidskými konkrementy. Prase bylo umístěno do vodní lázně a exponováno rázovými vlnami. Počátkem roku 1987 byl zaveden do klinické praxe první litotryptor s ultrazvukovým zaměřením.



Obr. 1. Schéma prvního litotryptoru na principu vodní lázně a ultrazvukového zaměřování

1. Pacient
2. Konkrement
3. Žlučník
4. Ultrazvuková sonda
5. Jiskřiště
6. Vodní lázeň
7. Okraje vzduchem plněného vaku
8. Kovový reflektor rázové vlny
9. Kondenzátor

Po zkušenostech s léčbou chirurgických a urologických pacientů v roce 1985 byly provedeny první experimenty, opět v Německu, zkoumající účinky rázové vlny na kostní tkáň a v roce 1988 byl léčen v Bochumi první pacient pro kostní pkloub. Na počátku 90. let byly zkoumány účinky rázové vlny na kalciové usazeniny v oblasti šlach (tendinitis calcarea). Pro léčbu pacientů v oblasti pohybového aparátu byly vyvinuty následně speciální přístroje k léčbě pomocí ESWT a od roku 1993 se léčba pomocí rázové vlny již standardně v léčbě pohybového aparátu používá. I lékaři v České republice měli možnost klinicky pracovat s radiální rázovou vlnou a seznámit se s výsledky léčby s použitím rázové vlny v léčbě pohybového aparátu, a to na I. Ortopedické klinice Fakultní nemocnice u svaté Anny v Brně v letech 2000 – 2001. V dnešní době se můžeme setkat například se specializovaným pracovištěm, kde je k dispozici biochirurgická léčba pomocí rázových vln [5].

1.3 Současné uplatnění v medicíně

Na základě výše zmiňovaných výzkumů a přínosných objevů v historickém vývoji, je dnes použití rázové vlny k léčebným metodám každodenní záležitostí. Výhody spočívají v tom, že se při odstraňování zmiňovaných chorob vyhneme chirurgickým zákrokům, tedy eliminace operačních a postoperačních komplikací. Nepříjemnosti mohou být potíže při vypuzování roztříštěných konkrementů z těla pacienta. Nezbytný tlak v močové trubici může být potom komplikací nejen u starších pacientů. K indikaci jsou vhodní zejména pacienti s konkrementy menšími než 2 cm.

Při použití litotryptoru s rentgenovým zaměřováním je nutné, aby se jednalo o tzv. kontrastní konkrement, tj. aby byl kámen dobře viditelný na rentgenovém snímku. Metodu však mohou podstoupit pacienti všech věkových kategorií, což je nespornou výhodou v případě kontraindikace celkové anestézie. Léčba je vhodná i pro pacienty s vysokým krevním tlakem, respiračními chorobami a obtížemi, diabetem, eventuálně pacienti s jednou funkční ledvinou. Metoda je kontraindikována u těhotných žen, u postižených hemofilií, při poruchách koagulace, při kalcifikaci ledvinových artérií, v případě přítomnosti aneurysmatu aorty, komorové arytmie, obezité, infekci

močových cest nebo při nespolupráci nemocného z různých důvodů. Pacienti s implantovanými kardiostimulátory podléhají vyššímu riziku možného poškození kardiostimulátoru elektromagnetickou indukcí (z důvodu průchodu vysokých proudů).

Urologická metoda - extrakorporální litotrypse rázovou vlnou je sice dominantní metodou léčby kamenů ledvinových a částečně ji lze použít i v některých speciálních případech konkrementů ve žlučníku, ale zdaleka to není jediná oblast působnosti rázové vlny. Neodmyslitelná je též v terapeutických metodách hepatogastroenterologie – zde je obrovská výhoda využít vlnu v endoskopicky neřešitelných případech konkrementů ve žlučových cestách. Stejně tak u konkrementů obturujících pankreatický vývod je rázová vlna alternativou. Případně při léčbě nemocných s chronickou kalcifikující pankreatitidou (litiáza pankreatického vývodu) k narušení intraduktálních konkrementů. Metodou volby jsou rázové vlny také pro kameny intrahepatální. Úspěšnost fragmentace je tady dokonce vyšší, než u kamenů v choledochu. Popsáno bylo i použití v některých atypických případech, jako je bezoár žaludku či objemný konkrement obstruující střevo (způsobující ileus) [3, 5].

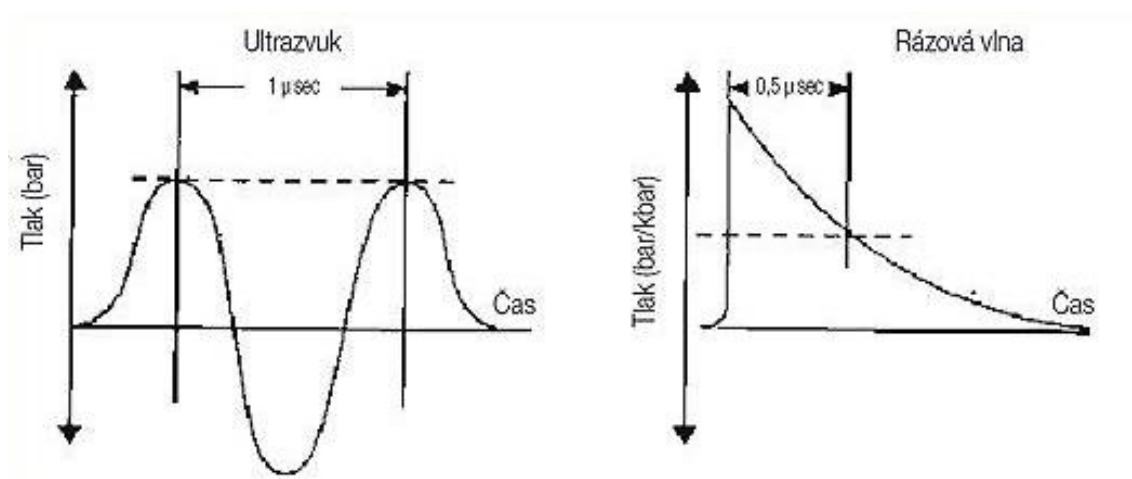
Polem široké působnosti je v dnešní době ortopedie. V posledních letech se pořád častěji v klinické praxi využívá nefokusovaných rázových vln malé amplitudy k odstraňování bolestí pohybového ústrojí, jako jsou tenisové lokty, golfová kolena, bolesti páteře, pseudoartrózy, odstraňování cementu při reoperacích endoprotéz apod. Pro léčbu úponových bolestí je také úspěšně využívá sportovní lékařství či rehabilitační centra. Mechanismus účinků rázových vln není v těchto případech znám, ale publikované výsledky hovoří o úspěšnosti 60–80 %. Ani veterinární lékařství nepostrádá oblast, ve které využívá účinků rázové vlny, zejména v péči o závodní koně [9, 10].

2 Charakteristika rázové vlny

Rázová vlna je významnou aplikací techniky a poznatků fyziky v terapii a klinické praxi. Léčba s pomocí rázových vln je bezpečná a efektivní. Bezpečnost a dodržování pravidel pro aplikaci je však stejně důležité, jako ve všech odvětvích medicíny. Neopatrná aplikace rázových vln je může znamenat pro zdraví pacienta nebezpečí [11].

Rázové vlny se vyznačují prudkou, teoreticky nespojitou změnou vlastností prostředí, ve kterém se šíří. Konkrétně - jde-li o tlakové rázové vlny, v materiálním médiu je na čele každé vlny vždy prudký nárůst tlaku, teploty a hustoty média.

Rázová vlna se liší od vlnění ultrazvukového v několika aspektech. Jednak tím, že se prostředím šíří jako jediný mohutný tlakový kmit trvající méně než $1 \mu\text{s}$ (doba nárůstu tlaku na hodnoty je 10 až 100 MPa za kratší dobu než 100 ns). Při průchodu rázové vlny médiem může být amplituda vlny tak vysoká, že zásadně mění vlastnosti média, kterým prochází. Též v periodicitě se vlastnosti vln rozcházejí. Na rozdíl od ultrazvuku, který má charakter sinusoidy s periodicky se střídající částí vlny pozitivní a negativní, je rázová vlna aperiodická. Výkon v rázové vlně má desítky až stovky kilowattů [12].



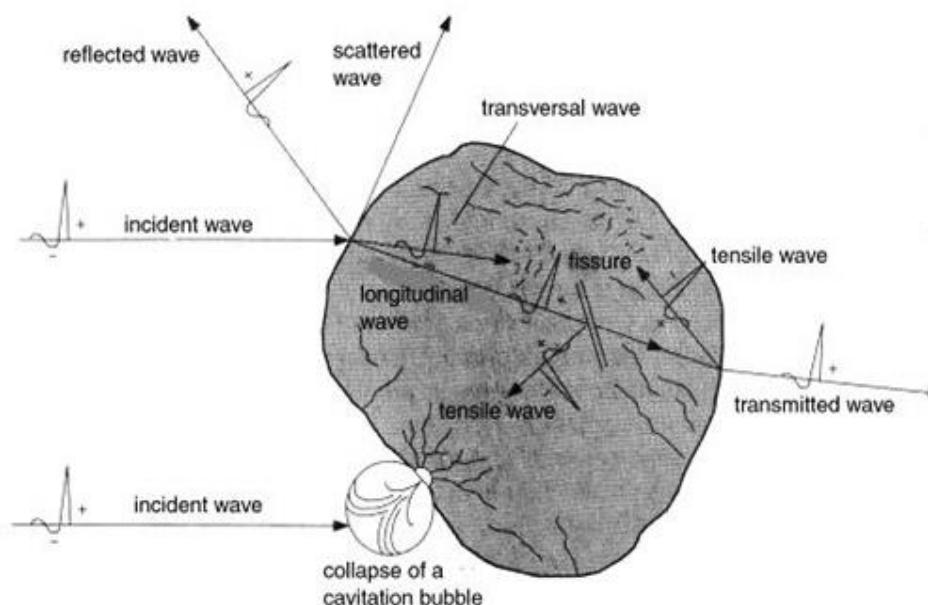
Obr. 2. Charakteristika průběhu ultrazvukového pulzu (periodické střídání pozitivní a negativní tlakové vlny) a rázové vlny, která se jeví jako jediný mohutný tlakový kmit s velmi krátkým časovým průběhem ($t < 1 \mu\text{s}$)

Průběh tlaku fokusované vlny v ohnisku v čase závisí na charakteristice zdroje. Primárním zdrojem silné rázové vlny v generátoru určeném pro desintegraci kamenů je silnoprúdová jiskra ve vodě. Je to bodový zdroj a složité nelineární procesy, jakým je kolaps bublin apod., se odehrávají v oblasti primárního ohniska a do oblasti sekundárního ohniska (exponovaného např. kamene) se podtlaková část vlny utlumí. Tak je eliminován vznik kavitací v sekundárním ohnisku, což je žádoucí právě v oblasti rozbíjení ledvinových kamenů – ohleduplnost vůči tkáni stěny ledvin.

Aplikace rázových vln je podstatou metody zvané litotrypsie extrakorporální rázovou vlnou (LERV) - Extracorporeal shock wave lithotripsy (ESWL). Uvedení této metody do praxe úplně změnilo charakter léčby litiázy. Nyní je možné odstraňování konkrementů jejich jednoduchou fragmentací. Několik stovek až tisíců rázových vln zaměřovaných pomocí elipsoidního reflektoru stačí k tomu, aby se žlučnickový nebo ledvinový kámen změnil na písek, který už může za jistých podmínek odejít přirozenými cestami. Míra poškození okolních měkkých tkání je přitom minimální [14].

Špičkové hodnoty kladného akustického tlaku rázové vlny litotryptorů se pohybují okolo 100 MP. Amplituda záporné části vlny je asi desetkrát menší. Přesto stačí k vyvolání expanze a následnému kavitačnímu kolapsu přítomných bublin. Speciálně těch, které se vytvářejí na povrchu pro nás zajímavého kamene. Mikrobublinky jsou poměrně nestabilní, aperiodicky zanikají, přičemž způsobují lokální nárůst teploty, účinek na tkáň je tedy i tepelný.

Rázové vlny působí nejen přímo, mechanickým stresem, ale i nepřímo - prostřednictvím kavitace a zvýšením teploty.



Obr. 3. Schéma - přímý a nepřímý efekt na konkrément

přímý efekt - tlakové a tahové síly (reflected and tensile wave)

nepřímý efekt - kavitační kolaps bublin (collapse of cavitation bubble)

Princip experimentálního generátoru je odlišný. Na povrchu kompozitní anody generuje poměrně malý tlakový impuls mnohokanálovým výbojem. K transformaci tohoto impulsu na rázovou vlnu tentokrát dochází až během jeho fokusace v těsném okolí ohniska! Tím, jak už bylo řečeno, vzniká poměrně silná vlna zředění překračující kavitační práh vody a kolabující kavitace tak generují sekundární, velmi krátkovlnné rázové vlny, které konečně interagují se strukturami buněčných rozměrů. Podrobněji o této problematice pojednává kapitola 2.2.

Řešíme zde mnoho akustických jevů, které lze charakterizovat vlnovým šířením v mediu (např. vodě, oleji, tkáni). Akustická energie rázových vln je v jistém smyslu jedinečná – tato energie proniká, na rozdíl od jiných forem, snadno a do dané míry intenzity bez poškození měkké tkáně. Vedle toho je snadné ji definovat do daného objemu [14, 15].

2.1 Zdroje rázových vln

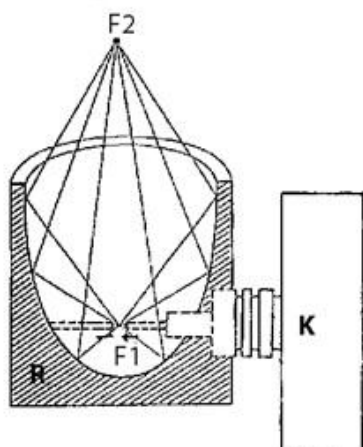
Ke generování rázových vln pro lékařské účely se používají zdroje tří typů. Generátory *elektrohydraulické, piezoelektrické a elektrodynamické*. Na základě výše řešeného principu vzniku vlny a jejího šíření má význam fakt, že v piezoelektrickém a elektrodynamickém generátoru vzniká rázová vlna teprve při cestě médiem. Což je důležité pro vedlejší účinky. Pro formování čela rázové vlny je přitom odsávána část energie z pozdější fáze vlny, kde dochází k prohloubení podtlakové fáze, tudíž negativních účinků na organismus.

2.1.1 Elektrohydraulický zdroj

Tento generátor sahá nejdále v historii problematiky rázových vln. Nejstarší princip vyvinutý v roce 1980 společností Dornier (Německo) byl zabudován do prvního klinicky použitého litotryptoru [13]. Výboj vznikající extrakorporálně ve vodním jiskřišti mezi dvěma hroty elektrod zapříčiní ve svém ohnisku vypaření vody. V daném místě se tím uvnitř kapaliny vytvoří kavitace, kterou si můžeme představit jako plynový kulový prostor, ten v krátkém časovém okamžiku výrazně expanduje a zvětšuje svůj objem. Tento jev nazýváme objemovou expanzí.

Expanze způsobí v okolním vodním prostředí prudké zvýšení tlaku. Jiskrový výboj mezi hrotovými elektrodami vzdálenými od sebe 1 mm způsobuje ve výbojovém kanálu extrémně vysoké tlaky řádu GPa (desítky tisíc atmosfér), vše při proudech kolem 10 kA [16, 17]. Tento energetický impulz se šíří do okolí všemi směry nadzvukovou rychlostí. V podobě divergentní kulové tlakové vlny, jejíž amplituda tlaku klesá s narůstající vzdáleností, je odražena kovovým reflektorem ve tvaru polo-elipsoidu (Eliptický otevřený reflektor). Šíří se vodní náplní a v sekundárním ohnisku (mimo elipsoid), v němž se nachází kámen, se opět zkoncentruje. V tomto bodě jsou účinky koncentrované energie největší. Voda má tělesnou teplotu a je odplyněna. Volné vzduchové bubliny jsou eliminovány. Je žádoucí, aby se energie rozptýlila, co nejvíce, bubliny tomuto jevu brání, v opačném případě je snížen účinek terapie.

Energii výboje je možné plynule nastavovat. Systém jiskřiště umožňuje regulaci vzdálenosti mezi hroty elektrod podle nastaveného napětí, kvality vody a stupně opotřebení elektrod. Systém výměnných elektrod představuje velmi nízké provozní náklady na pacienta. Opotřebované hroty obou elektrod mohou být přebroušeny několikrát, hrot dlouhé elektrody lze při úplném opotřebení nahradit hrotem novým [14].



- F1 – primární ohnisko (mezi hroty elektrod vzniká vlna)
- F2 – sekundární ohnisko (exponovaný předmět)
- R – kovový reflektor
- K – kondenzátor (zdroj napětí)

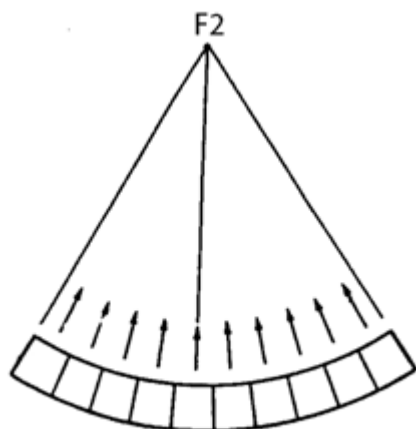
Obr. 4. Schéma elektrohydraulického generátoru

2.1.2 Piezoelektrický generátor

Tento generátor byl zkonstruován prvně v roce 1985. Piezoelektrický zdroj je sestaven z několika keramických tělísek (piezoelementů). Ty jsou rozloženy po ploše dutiny tvaru kulového vrchlíku (sférický talíř), což vytváří vlastní fokusovací zařízení. Piezoelektrické elementy jsou rozkmitávány přiváděnými elektrickými impulzy, které generují zvukové vlny šířící se do prostředí. Specifické jsou malý rozměr ohniska, nízká amplituda tlaku a vysoká opakovací frekvence v oblasti ultrazvukového vlnění. Jedná se o přeměnu elektrické energie v mechanickou. U piezoelektrického jevu je tomu naopak – elektrické pole působí na krystal. Vyšší energie dosahujeme pouze v místě ohniska, kde se všechny jednotlivé vlny spojují. Energie emitovaná jednotlivými prvky je jinak slabá [18].

Obecnou výhodou je fakt, že ohnisková zóna je malá, existuje zde možnost pracovat s vyšší frekvencí a aplikovat tak větší počet rázů. Piezoelektrické zdroje

rázové vlny jsou velmi spolehlivé. Právě nižší hodnota tlaků rázových snižuje efektivitu léčby, na druhé straně zajišťuje jistý komfort pacientům, který spočívá v nebolestivosti v oblasti přechodu na kůži.



- šipky směřují do ohniska F2, směr šíření vln
- řada čtverců představuje piezoelementy

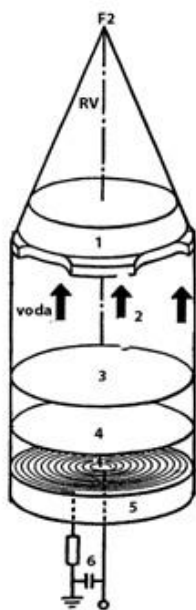
Obr. 5. Schéma piezoelektrického generátoru

2.1.3 Elektromagnetický generátor

Princip tohoto generátoru spočívá v elektromagnetickém jevu. Přístroj sestává z ploché elektromagnetické cívky, na ní uložena kovová membrána. Ve chvíli, kdy je vysoké napětí aplikováno na cívku, kovová membrána se rozkmitá a vznikne akustická vlna. Jde o rovinnou vlnu, která postupuje vodním prostředím paralelním směrem. K zaměření rovinné tlakové vlny se používá systém akustických čoček. Výhodou systému akustických čoček je možnost rázování řádově ve stovkách tisíc bez známky opotřebení systému.

Ve srovnání s hydraulickým generátorem narazíme opět na nevýhodu v menší síle rázové vlny, je zde stanoveno velmi dlouhé ohnisko a setkáváme se se silnými vedlejšími účinky. Projevem jsou kavitace a traumatizovaná okolní tkáň.

Generátor tohoto principu využila prvně firma Siemens v roce 1986 u přístroje Lihostar. Zakomponování dvou elektromagnetických zdrojů do tohoto litotryptoru bylo po obou stranách pacienta, ten ležel na zádech na klasickém RTG stole. [19]



1. Systém akustických fokusovacích čoček
2. Šípky představují akustickou rovinnou vlnu
3. Kovová membrána
4. Izolační folie
5. Plochá elektrická cívka s keramickým dnem
6. Zdroj napětí

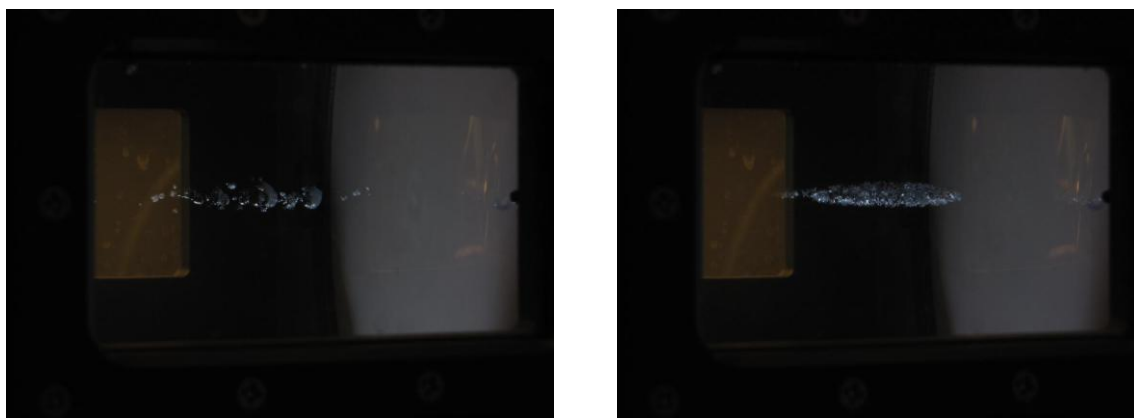
Obr. 6. Elektromagnetický generátor

2.2 Princip experimentálního generátoru

Po zkušenostech a nabytých znalostech z výzkumů čištění vody pomocí výbojů byl, ve spolupráci s Ústavem fyziky plazmatu Akademie věd ČR, vytvořen nový zdroj generující rázové vlny. Tentokrát mnohokanálovým výbojem. Bylo pozorováno, že pokud je kompozitní elektroda v silně vodivé vodě, tvoří se na ní mnoho výbojových kanálků, které rovnoměrně pokrývají celý povrch elektrody. K získání výboje byla tedy použita válcová kompozitní elektroda (\varnothing 60x100mm, povrch cca 200cm²) potažená tenkou vrstvou porézní keramiky (kompozitní anoda).

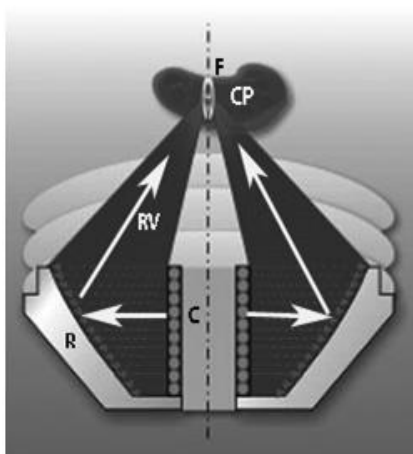
V každém póru anody vzniká ve vodě (slaný roztok s vodivostí okolo 15 mS/cm) se zvýšenou elektrickou vodivostí výbojový kanál (český patent č. 291 158, udělený 30. 10. 2002) a superpozicí se následně získá tlaková vlna cylindrického tvaru šířící se

rovnoměrně od anody. Tato vlna je fokusována kovovým parabolickým reflektorem a po zaměření vzniká silná rázová vlna s vzrůstem tlaku na 100 MPa za čas 50 ns. Na vlnu rázovou se transformuje však až v těsném okolí ohniska. Tím je zároveň dosaženo toho, že podtlaková fáze vlny dosahuje v ohnisku hodnot velikostně kolem 25% tlakové fáze vlny (- 25 MPa). Překračuje tedy kavitační práh vody. Kolabující kavitace generují sekundární, velmi krátkovlnné (vlnová délka < 100 μm) rázové vlny, které už mohou interagovat se strukturami buněčných rozměrů, biologickou tkání.



Obr. 7., Obr. 8. Fotodokumentace generované kavitace

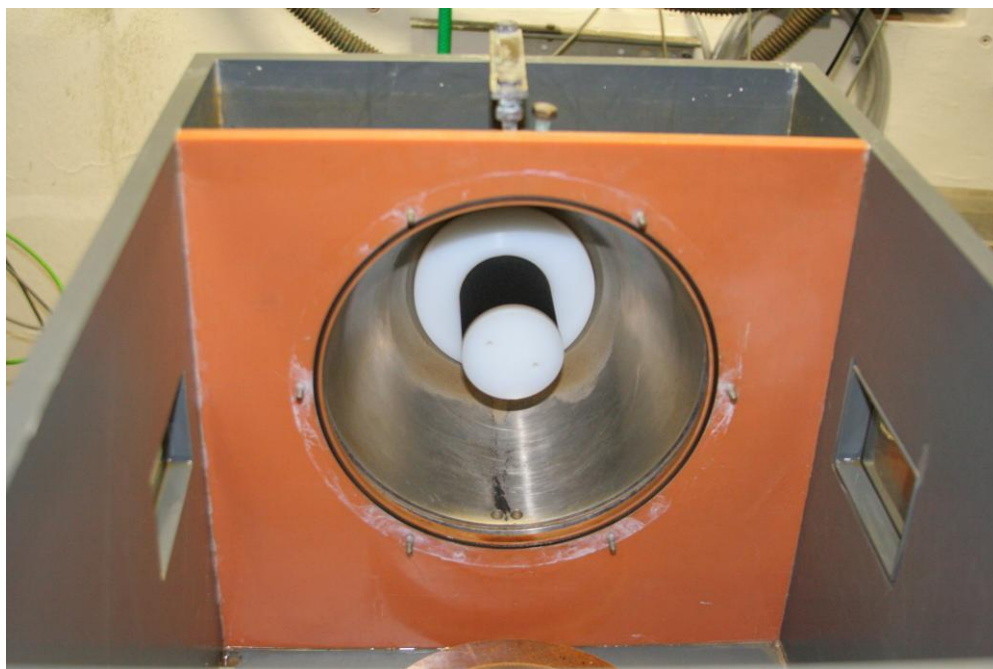
Čelo vlny postupuje do neporušené vody rychlostí zvuku. Následující části vlny se šíří do již stlačené vody, tedy větší rychlostí a postupně zmenšují náskok čela, čímž se vytváří téměř skoková změna tlaku. Za tlakovou fází následuje silná vlna zředění. Překročí-li amplituda vlny zředění kavitační práh (pevnost vody v tahu), vznikají kavitace. Ty při svém kolapsu mohou narušovat buňky. Průměr ohniska na poloviční amplitudě tlaku je 2,5 mm. U tohoto nového generátoru bylo experimentálně prokázáno, že rozměr ohniska je $\varnothing 2,5 \times 35$ mm. Poměr tlakové a podtlakové fáze FRV je možné ovlivňovat parametry obvodu a regulovat tak oblast vznikajících kavitací [17, 20].



- R – parabolický reflektor
- C – cylindrický zdroj RV
- F – sekundární ohnisko RV
- CP – cílový předmět

Obr. 9. Princip elektromagnetického cylindrického zdroje

Kvůli potřebě lepší lokalizace účinků rázové vlny se pro další experimenty provedla změna. Kompozitní anoda byla rozdělena na dvě části, které se napájely ze dvou impulsních zdrojů s časovým zpožděním. Vznikla zde možnost generovat dvě po sobě následující rázové vlny fokusované do společného ohniska (Tandemové rázové vlny)! Předpokládalo se, že první vlna vytvoří v prostředí akustickou nehomogenitu (teoreticky kámen) se kterou bude následující zpožděná vlna silně interagovat (zpoždění < 100 ms) [17].



Obr. 10. Experimentální generátor

3 Krev

3.1 Fyziologie krve

V krevních cévách (tepších, vlásečnicích a žíách) proudí krev. Je to červená, vazká, neprůhledná tekutina. Její množství závisí na hmotnosti těla, na věku i pohlaví. Objem činí zhruba 5,5 l, tedy 6 – 8 % tělesné hmotnosti. Krev se skládá z tekuté fáze - plazmy (54%) a krvinek, normální hodnoty objemu červených krvinek jsou 47% (+-5%) u mužů a 42% (+-4%) u žen. Poměr mezi objemem červených krvinek a plné krve se dá zjistit hematokritem. Jedná se tedy o procentuální vyjádření objemu erytrocytů v jednotce krve. Závisí však na počtu a velikosti červených krvinek. Patří do základního vyšetření krevního obrazu. Erytrocytům patří celá kapitola 3.1.1.

Krevní složky jsou červené krvinky, bílé krvinky a krevní destičky (ty však nejsou vlastní buňky, nýbrž vznikají odloučením z velkých buněk kostní dřeně [21, 22]).

Nedílnou součástí krve je plazma. Tvořena z 92 % vodou, zbytek jsou v ní rozpuštěné látky anorganické i organické. Z anorganických je to zvláště chlorid sodný a kyselý uhličitán sodný. Tyto mají význam pro reakci krve, která činí pH 7,4. Krevní plazma je významným regulátorem acidobazické a osmotické rovnováhy. Osmotický tlak plazmy odpovídá roztoku NaCl o koncentraci 0,15 mmol/l, tzv. fyziologickému roztoku. Organickou složku plazmy tvoří především krevní proteiny, dále glukóza, tuky, vitamíny, hormony, žlučová barviva i dusíkaté neproteinové látky, jako močovina a kyselina močová. Krevní proteiny jsou albuminy, globuliny a fibrinogen.

Krev má za úkol transportovat mnoho látek (kyslík, oxid uhličitý, živiny, metabolity, vitamíny, elektrolyty), oteplovat a ochlazovat organismus pomocí transportu tepla.

Krevní oběh také přenáší do tělesných orgánů a tkání významné chemické informace z endokrinních žláz prostřednictvím hormonů. Nebo naopak dochází ke vstřebávání takových látek z tkání do krve, které jsou pro tělo škodlivé. Z nich zmíníme hlavně oxid uhličitý. Odvádí i další odpadové látky metabolismu. Tyto odpadní látky, metabolity, svádí z tkání míza, lymfa, která vzniká ve většině orgánů, z nich prochází tělem lymfatickými cévami, které tvoří mízní soustavu.

Funkce krve jsou celkově mnohostranné a složité. V základním členění se rozlišují tyto funkce na specifické a transportní. Ke specifickým funkcím patří schopnost udržovat homeostázu, to znamená stálost a rovnováhu vnitřního prostředí organismu, především osmotický tlak, míru kyselosti, teplotu, koncentraci důležitých látek atd., dále obranné funkce a schopnost srážení. Schopnost krve se srážet je velmi podstatná pro přirozený obranný mechanismus těla. Pomáhá ničit choroboplodné mikroorganismy a uplatňuje se při obraně proti infekcím.

K transportním funkcím krve patří přenášení dýchacích plynů, rozvod živin, přenášení hormonů, vitamínů, odvádění zplodin, účast na řízení těla, rozvod tepla po těle, vyrovnávání teplotních rozdílů mezi orgány.

Funkce krve souvisí s mnoha tělesnými orgány a jejich úlohami, především se slezinou, s játry, brzlíkem, ale také například s ledvinami, zažívacím ústrojím atd. Důležitou roli hraje význam krve v dědičnosti a při sklonu k některým druhům onemocnění. Krevní transfúze může vyloženě zachránit lidský život. Biochemické laboratorní vyšetření krve umožňuje získat mnoho důležitých informací o celkovém stavu lidského organismu a orgánů [23].

Z hlediska experimentu jsou pro nás však významnou kapitolou červené krvinky.

3.1.1 Erytrocyty

Červená krvinka - erytrocyt je velmi specializovaná buňka, jejíž struktura i biochemické vlastnosti vypovídají o jejím dokonalém přizpůsobení se funkcím. Hlavní funkcí je transport dýchacích plynů - kyslíku (z plic ke tkáním) a oxidu uhličitého (od tkání do plic). Navíc se erytrocyty podílejí na udržování pH krve.

Pro transport dýchacích plynů je krvinka dobře přizpůsobivá. To proto, že erytrocyt je bezjaderná buňka, která při svém vyžívání ztratila i ostatní cytoplazmatické organely. Ztrátou organel se tudíž změnil její tvar - podobá se bikonkávnímu disku, který je schopen změny tvaru.

Počet erytrocytů je u dospělého člověka velmi stálá hodnota, která se mění jen v nepatrném rozmezí. Zvýšení červených krvinek nad horní hranici nazýváme hypererytrocytóza (polycytemie) a naopak úbytek pod dolní hranici je erytrocytopenie (oligocytemie), která také znamená úbytek hemoglobinu v krvi (anemie). Silným podnětem pro zvýšení počtu erytrocytů je pokles parciálního tlaku kyslíku v arteriální krvi. Klesne - li počet červených krvinek u muže pod 4,5 milionů a u ženy pod 4 miliony jedná se o patologický stav, ale krátká vydatná námaha může zase zvýšit počet červených krvinek, skrz zahuštění krve z důvodu úbytku části tekutiny v cévním řečišti. U novorozenců je počet erytrocytů velice vysoký, a to 6-7 mil/mm³. Rychle však klesá během čtrnácti dnů po narození na hodnoty nepatrně vyšší, než hodnoty dospělého člověka [23, 24].

V suchém krevním nátěru má červená krvinka průměr $7,2 \pm 0,4 \mu\text{m}$. Krvinky o tomto průměru nazýváme normocyty. V krvi se normálně vyskytují i krvinky menší a větší (mikrocyty a makrocyty). Tento stav se označuje jako fyziologická anizocytóza a graficky se vyjadřuje Price – Jonesovou křivkou. Tloušťka krvinek je 1,8 až 2,5 μm , střed krvinky cca 0,8 μm . Povrch erytrocytů je okolo 130 - 140 μm^2 .

Povrch erytrocytů je určen buněčnou membránou, která zprostředkovává výměnu látek mezi červenou krvinkou a okolním prostředím a také tvoří částečnou bariéru proti pronikání rozpuštěných látek. Samotná membrána se skládá z lipidové dvojvrstvy a

asymetricky uspořádaných proteinů. Také oligosacharidové jednotky, vázané na bílkoviny a lipidy, které tvoří zevní povrch membrány. Bílkoviny buněčné membrány (membránový skelet) umožňuje deformaci červených krvinek při průchodu kapilárami. Na vnějším povrchu membrány jsou lokalizovány aglutinogeny (glykoproteiny a glykolipidy), které určují antigenní vlastnosti erytrocytů [24].

3.1.2 Hemoglobin a hemolýza

Hlavní stavební složkou erytrocytů je červené barvivo – hemoglobin, který tvoří 95% sušiny. Je schopen reverzibilně vázat a uvolňovat kyslík a oxid uhličitý. V 1 litru krve je 120 - 180 g Hb a 1 g Hb váže 1,34 ml kyslíku.

Hemoglobin je jedna z nejvýznamnějších molekul živočišné říše a patří mezi chromoproteiny. Je to konjugovaná bílkovina, která je tvořena čtyřmi podjednotkami. Každá podjednotka je tvořena z prostetické skupiny HEM (s centrálně uloženým dvojmocným železem a váže kyslík) a z globinu, který váže oxid uhličitý a je tvořen polypeptidovými řetězci, kdy vždy dva a dva řetězce jsou stejné. Jednotlivé typy řetězců se liší sekvencí aminokyselin, jichž je v každém řetězci okolo 140. Stavba polypeptidových řetězců (např. α , β , γ , δ) udává typ hemoglobinu. Tvorba hemu (protoporfyrinu IX s centrálně uloženým dvojmocným železem) je zahájena v mitochondriích kondenzací glycinu a sukcinyl koenzymu A. Vzniká kyselina aminolevulová, která je základem pro syntézu protoporfyrinu IX v cytoplazmě. Globinové řetězce jsou syntetizovány na základě genetické informace ribosomy.

V průběhu vývoje člověka se postupně vytváří několik různých typů hemoglobinu vzhledem k různým podmínkám sycení hemoglobinu kyslíkem (parciální tlak kyslíku). V průběhu embryonálního vývoje to jsou embryonální hemoglobiny GOWER 1 a GOWER 2. V období fetálního vývoje je přítomen fetální hemoglobin (HbF). Tento fetální hemoglobin je po narození nahrazen hemoglobinem dospělého člověka typu HbA a je obsažen v krvinkách po celý život [23, 25].

Podle látky, která se na hemoglobin naváže, rozeznáváme různé deriváty hemoglobinu.

oxyhemoglobin: na 1 molekulu hemoglobinu se mohou navázat čtyři molekuly kyslíku, navázání jedné molekuly kyslíku zrychluje vazbu dalších kyslíkových molekul (alosterický efekt), vazba kyslíku je reverzibilní, změnou $p\text{CO}_2$ (vzestup), pH (pokles) a vyšší teplotou, afinita kyslíku k hemoglobinu klesá a kyslík se může z hemoglobinu uvolnit, opačná situace afinitu hemoglobinu ke kyslíku zvyšuje

karbaminohemoglobin: sloučenin vzniká vazbou hemoglobinu (NH_2 skupiny globinových řetězců) s oxidem uhličitým, také tato vazba je reverzibilní, deoxygenovaný hemoglobin váže snadněji oxid uhličitý

karboxyhemoglobin: sloučenina vzniká vazbou hemoglobinu s oxidem uhelnatým, afinita hemoglobinu k oxidu uhelnatému je vyšší než ke kyslíku, malé množství CO ve vdechovaném vzduchu může zabránit vazbě hemoglobinu s kyslíkem a vznikne smrtelná otrava CO

methemoglobin: vzniká působením oxidačních činidel na hemoglobin, dvojmocné železo se mění na trojmocné a hemoglobin ztrácí schopnost reverzibilně vázat a uvolňovat kyslík

Červené krvinky mají značnou propustnost a deformaci a jsou citlivé vůči různým vlivům. Jejich membrána se reverzibilně nebo ireverzibilně porušuje fyzikálními a chemickými činiteli a obsah erytrocytů vytéká ven z buňky. Tento stav nazýváme hemolýza. Rozeznáváme několik typů hemolýzy.

Osmotická hemolýza - erytrocyty v hypotonickém prostředí přijímají vodu, zduřejí se a bikonkávní disk se mění v kouli. Což má za následek vznik membránových defektů, jimiž uniká hemoglobin a další látky. Tato změna membrány je za určitých podmínek reverzibilní. Normální erytrocyty mají vůči hypotonickým roztokům odolnost, ale starší erytrocyty jsou fragilnější a hemolyzují dříve, mladší erytrocyty jsou ireverzibilnější. V hypertonickém roztoku naopak krvinky vodu odevzdávají a svrašťují se.

Fyzikální hemolýza probíhá při silném třepání, šlehání, působení ultrazvuku, nebo při vysoké nebo nízké teplotě.

Chemická hemolýza spočívá v účinku látek, které rozpouštějí nebo chemicky reagují s lipidy v erytrocytární membráně. Patří sem vliv tukových rozpouštědel, silných kyselin a zásad a látek silně snižujících povrchové napětí.

Toxickou hemolýzu způsobují některé bakteriální toxiny nebo hadí, protozoární a rostlinné jedy.

Imunologická hemolýza nastává hlavně jako patologický fenomén působením vazby protilátek s komplementem. Těmito lytickými účinky vznikají membránové defekty a z buňky unikají makromolekuly i bez osmotického zduření [24, 26].

Krev je suspenze krvinek ve viskozní plazmě. V krvi proudí v oběhové soustavě krvinky stejnoměrně rozptýleny. Necháme-li stát nesrážlivou krev v nádobě, rozdělí se její součásti podle své hustoty. Hustota erytrocytů je větší než hustota jejich prostředí. Rychlost jejich sedání (sedimentační rychlost) je za fyziologických podmínek stálá a je nepřímo úměrná suspenzní stabilitě krve. Čím je suspenze krvinek stabilnější, tím pomaleji sedimentují, a naopak [25].



Obr. 11. Vzorek sedimentované a vzorek plné nesrážlivé krve

Rychlost sedimentace erytrocytů závisí na interakci mezi protichůdnými fyzikálními silami. Nejdůležitějším faktorem je velikost sedimentujících částic. Červené krvinky totiž mají tendenci penízkovatět, vytvářet válečkové agregáty (rouleaux) o velkém objemu a relativně malém povrchu. Tyto sloupečky klesají rychleji než odpovídající počet jednotlivých krvinek o stejném celkovém objemu. Proto rozhodující význam pro rychlost sedimentace má rychlost penízkovatění a velikost agregátů.

Zvýšení tvorby agregátů je nejhlavnější příčinou zrychlené sedimentace při různých chorobných stavech, v těhotenství apod. Podstata zvýšené agregace není známá. Úlohu zde zřejmě hrají látky podporující tvorbu válečkovitých agregátů např. bílkoviny v okolí plazmy, zejména fibrinogen a γ - globuliny. Proto změna sedimentační rychlosti odráží změny obsahu těchto plazmatických proteinů. Vzestup koncentrace fibrinogenu v plazmě vede ke značnému zvýšení sedimentační rychlosti. Podobný, ale poněkud menší účinek má rozmnožování globulinů, zejména o vysoké molekulové hmotnosti. Ke zrychlení sedimentace dochází také při úbytku erytrocytů (oligocytemii).

Měření rychlosti sedimentace erytrocytů zavedl v roce 1924 WESTERGEN (standardní metoda Fahreus-Westergenova). Obvyklé hodnoty u zdravých dospělých osob činí u mužů 2 - 5 mm za 1 hodinu, u žen, které mají méně erytrocytů a více fibrinogenu, 3- 8 mm za 1 hodinu. Měření sedimentační rychlosti je nespecifická zkouška, jejíž hlavní význam je orientační. Můžeme ji přirovnat k měření tělesné teploty, tepové frekvence. Poskytuje informaci pouze obecného charakteru. Zrychlení sedimentace je svědectvím přítomnosti a intenzity řady chorobných stavů. Sedimentace erytrocytů je zpravidla zrychlena u celkových akutních infekcí, u místních zánětů, při některých nádorových onemocnění. Je důležité, že u více nebo méně skrytých chorob je často pouhá změna sedimentační rychlosti, která je varovným signálem a podnětem k dalším vyšetřením. Za fyziologických okolností se sedimentace zrychluje ve druhé polovině těhotenství a při menstruaci [24, 25].

3.2 Rázová vlna a účinky na složky krve

Jsou známy interakce rázových vln s biologickými strukturami. V našich experimentech byly sledovány účinky na erytrocyty lidské krve. Po aplikaci rázové vlny dochází jednoznačně k jejich hemolýze. Při sledování lymfocytů byl zjištěn pokles jejich životnosti.

Byly aplikovány jak jednoduché, tak tandemové (interagující) vlny, což jsou běžné jednoduché rázové vlny jdoucí za sebou za velmi krátkou časovou prodlevu. Princip interagujících rázových vln byl podrobněji vysvětlen výše v kapitole 2.1.4.

V rámci několika experimentů byl též pozorován značný vliv umístění exponovaného materiálu. A to: s rostoucí vzdáleností od ohniska fokusace se prudce snižoval účinek. Vzorky krve umístěné v ohnisku jsou prokazatelně hemolyzované. Rozdíl od těch umístěných mimo ohnisko byl pozorovatelný pouhým okem.

4 Cíle

Sledováním biologických účinků rázové vlny v experimentech na lidské krvi in vitro jsme se přesvědčili o existenci jisté interakce na úrovni rázová vlna – buněčná struktura. Tyto účinky jsou již známy z oblasti litotrypsie extrakorporálními rázovými vlnami (LERV).

Komparativním způsobem jsem vyhodnotila účinek jednoduchých (JRV) a interagujících (IRV) rázových vln, a to na míru hemolýzy jednotlivých krevních vzorků, na životnost lymfocytů a buněk linie K-562. Užita byla spektroskopická metoda. Opakovanými experimenty jsme určili rozdíly v míře hemolýzy při změně počtu rázu a rozdílu mezi JRV a IRV.

Umístíme-li buňky měkkých tkání do ohniska rázových vln – je možné je bezkontaktně narušovat tandemovými rázovými vlnami. Jejich hlavním účinkem je tedy mechanické narušení buněčných membrán.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 Metodika a materiál

Fyziologii biologického materiálu se věnuji v celé kapitole 3 teoretické části práce.

5.1 Příprava materiálu

Nejprve byla ambulantně odebrána plná krev zdravých dárců. Pro každý experiment v množství okolo 20 ml. Použity byly tři zkumavky o objemu 7 ml, které současně zajistili nesrážlivost krve na nezbytně dlouhou dobu.

K laboratorní přípravě suspenze byly, s laskavým svolením zaměstnanců, využívány prostory Oddělení experimentální radiobiologie Ústavu biofyziky a informatiky Univerzity Karlovy pro nezbytné technické a zároveň sterilní zázemí. Krev zde byla odebrána tentokrát do heparinu.

K vyhotovení finální suspenze jsme použili totožný objem fyziologického roztoku, ředění tedy vypovídá hodnotu 1:1. Takto zhotovený nesrážlivý materiál jsme rozpipetovali do zkumavek značky ependorff o objemu 1,4 ml.

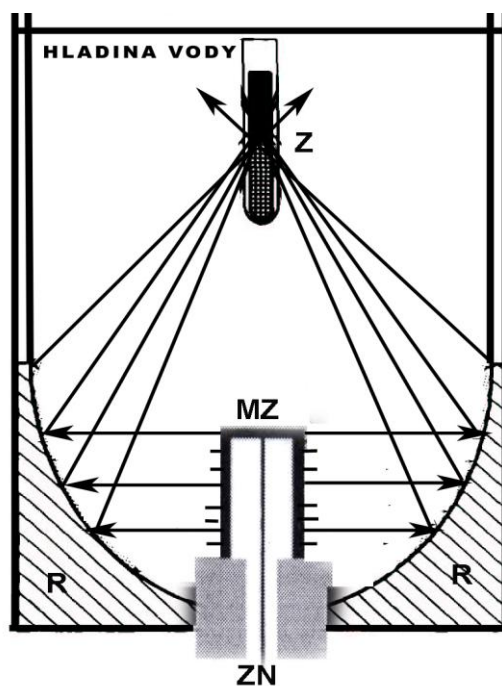
Připravené vzorky jsme následně dopravili v chladicím boxu na Ústav fyziky plazmatu, kde bylo provedeno exponování. Výsledky uvádím v tabulce xx.

Kontinuální buněčná linie K-562 byla získána od pacienta s chronickou myeloidní leukémií, konkrétně z pleurálního výpotku třiapadesátileté ženy v terminálním stádiu. Rozsáhlé studie o této linii byly prováděné laboratoří Anderson. U K-562 buněčných linií bylo právě zde objeveno široké využití, jako je syntéza hemoglobinu, protinádorové testování, diferenciací, farmakodynamika, klonování, testy cytotoxicity, buněčná biologie, buněčné účinky hypertermie. K-562 má podobné rysy jako raná fáze erytrocytu, granulocytu či monocytu.

Vzorky buněčné linie K-562 nám k experimentům poskytlo Oddělení experimentální radiobiologie Ústavu biofyziky a informatiky.

5.2 Exponování materiálu

Exponování probíhalo vždy totožně podle stanoveného plánu. Použita byla anoda generující jednoduchou rázovou vlnu. Následně byl využit princip mnohakanálového výboje na ploše cylindrického válce (kapitola 2.1.4). Využívalo se již probírané interference dvou rychle po sobě jdoucích jednoduchých vln, se zpožděním cca 5 μ s. Pozitivní tlaky dosahovaly až 100 MPa při 30 kV. Schéma experimentálního uspořádání je na obrázku 14.



Obr. 12. Schéma přípravku s exponovaným vzorkem

ZN – Zdroj vysokého napětí 15 – 30 kV

R – Kovový reflektor RV

MZ – Mnohakanálový zdroj s válcovou elektrodou

Z – Zkumavka ependorff s exponovaným materiálem

5.3 Stanovení uvolněného hemoglobinu

Po řádném exponování všech sérií vzorků zbývalo stanovit uvolněný hemoglobin. K tomu bylo zapotřebí centrifugy. Pro první experimenty sloužil k centrifugaci přístroj na Ústavu fyziky a informatiky VFN. K dalším, za účelem těchto experimentů zakoupená, centrifuga na Ústavu fyziky plazmatu v Ládví, což značně usnadnilo logistiku výzkumu.

Centrifugování se provedlo vždy za stejných podmínek. 3000 otáček/min po dobu 10 min. Hladina volného hemoglobinu byla stanovována spektrofotometrickou metodou. K měření se použila plazma získána pipetováním z každého vzorku po centrifugaci.

Metoda je založená na měření takto získané plazmy s uvolněným hemoglobinem, který má své absorpční maximum při 415 a 460 nm pro kontrolní vzorky (s nízkou koncentrací hemoglobinu), které jsme v každém z experimentů uchovali. U exponovaných vzorků, logicky s vyšším stupněm hemolýzy, byla koncentrace volného hemoglobinu určována z absorbance při 540 nm, s použitím absorpčního koeficientu $E^{1\%} = 8,5$.

6 Výsledky

1. Experiment 1 ze dne 7.12.2010

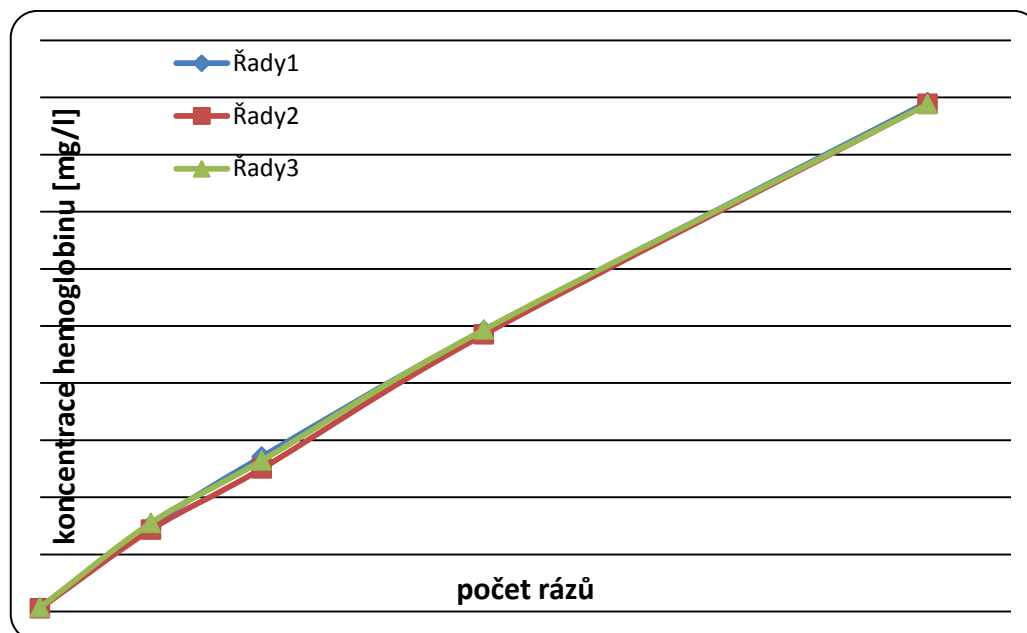
Sledování hemolýzy erytrocytů na počtu rázů IRV

1,8 ml vzorku krve převedeno pipetou do PE trubičky k rázování, vzorky umístěny podélně v ohnisku, po aplikaci IRV odebráno z PE trubičky 1.5 ml do PP zkumavky eppendorf k separaci uvolněného hemoglobinu. Následně spektrofotometrické stanovení hemoglobinu měřením absorbance na 576 nm.

Vzorky hemoglobinu byly ředěny DI vodou v poměru 1:40.

Tabulka 1: Závislost koncentrace hemoglobinu na počtu rázů IRV

	koncentrace hemoglobinu (mg/l)		
počet rázů IRV	Řady 1	Řady 2	Řady 3
0	1,37	1,13	1,42
40	30,24	28,69	31,05
80	54,21	50,1	52,9
160	98,4	97	98,68
320	178,31	177,7	177,56



Graf 1: Závislost hemolýzy erytrocytů na počtu rázů IRV

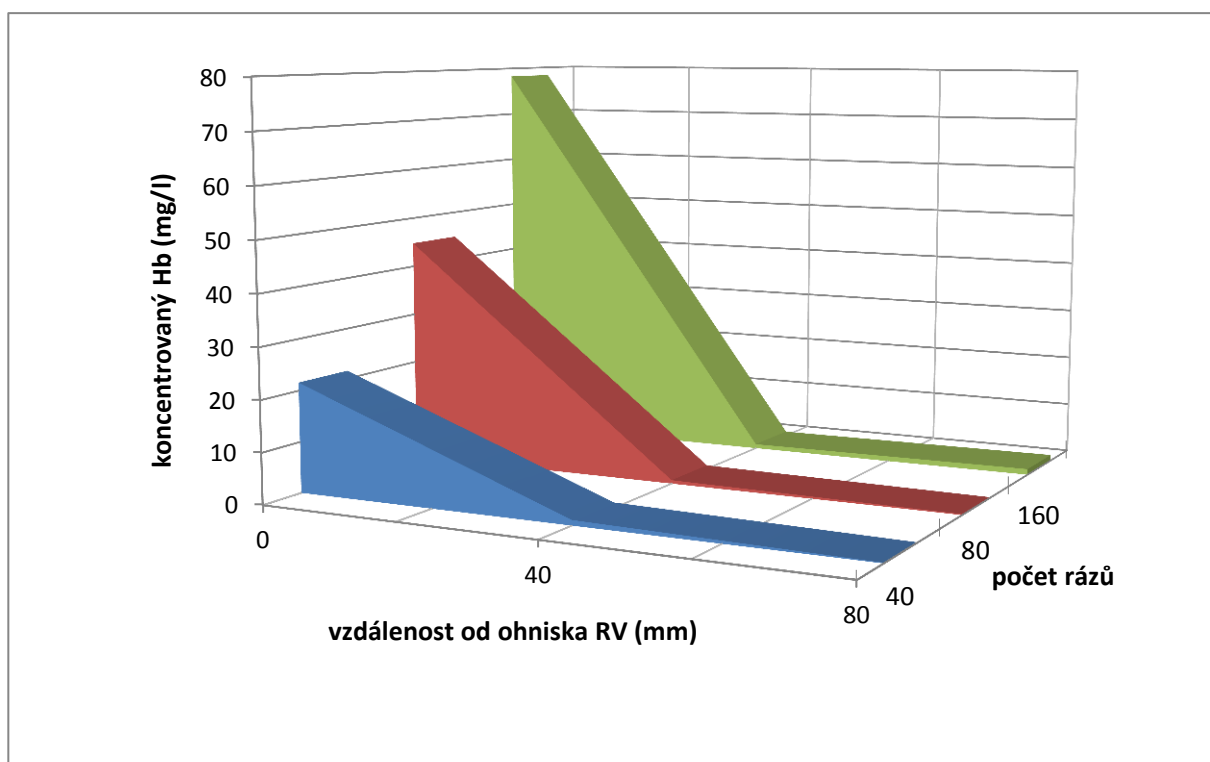
2. Experiment 2 ze dne 26.10.2010

Sledování hemolýzy v závislosti na počtu rázů a vzdálenosti od ohniska

Interagující rázové vlny mají silné biologické účinky v ohnisku, kdežto mimo něj účinky rapidně klesají, až k zanedbatelné hodnotě.

Tabulka 2: Závislost hemolýzy erytrocytů (koncentrace hemoglobinu v mg/l) na počtu rázů IRV a vzdálenosti od ohniska

vzdálenost od ohniska (mm)	počet rázů IRV		
	40	80	160
0	21,59	44,80	78,28
40	1,04	0,69	0,86
80	0,12	0,17	1,14



Graf 2: Závislost hemolýzy erytrocytů na počtu rázů IRV a vzdálenosti od ohniska

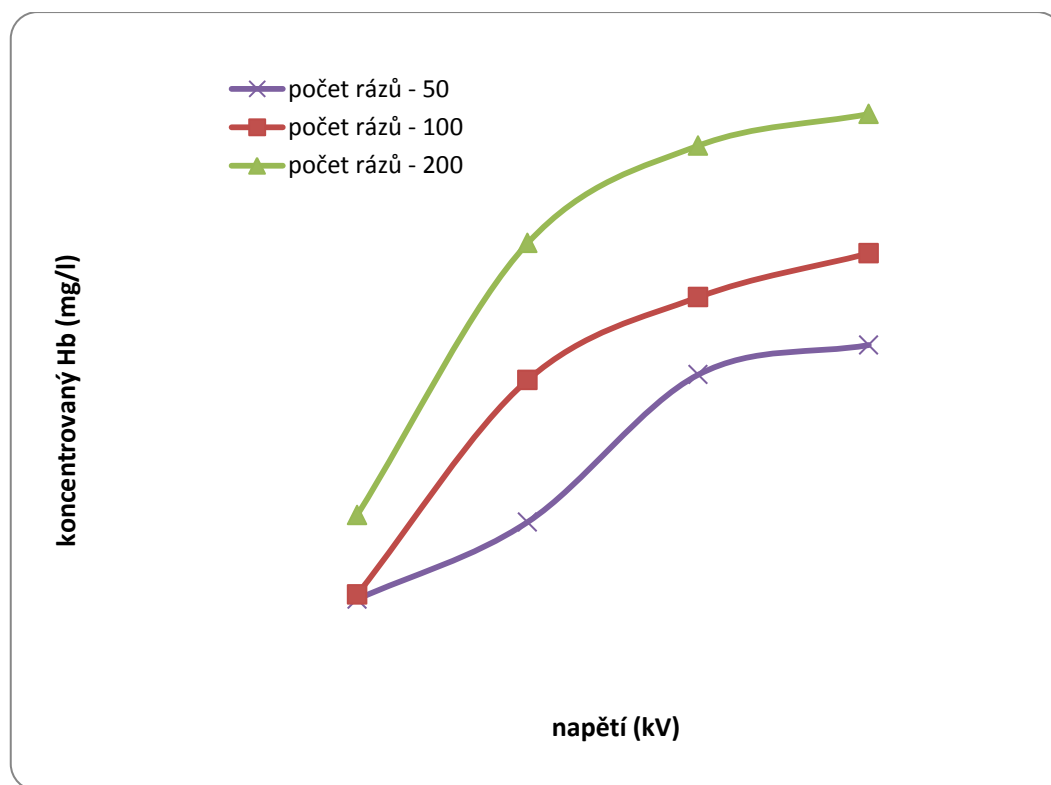
3. Experiment 3 ze dne 26.10.2010

Sledování změny hemolýzy v závislosti na napětí u JRV

Hemolýza interagující rázové vlny je znatelnější při vyšším napětí a větším počtu rázů.

Tabulka 3: Závislost hemolýzy erytrocytů (koncentrace hemoglobinu v mg/l) na počtu rázů JRV při různém napětí

napětí (kV)	počet rázů JRV		
	40	80	160
15	10,20	11,49	33,04
20	31,20	69,80	107,00
25	71,24	92,30	133,45
30	79,30	104,21	142,07



Graf 3: Závislost hemolýzy erytrocytů (mg/l) na počtu rázů JRV při různém napětí (kV)

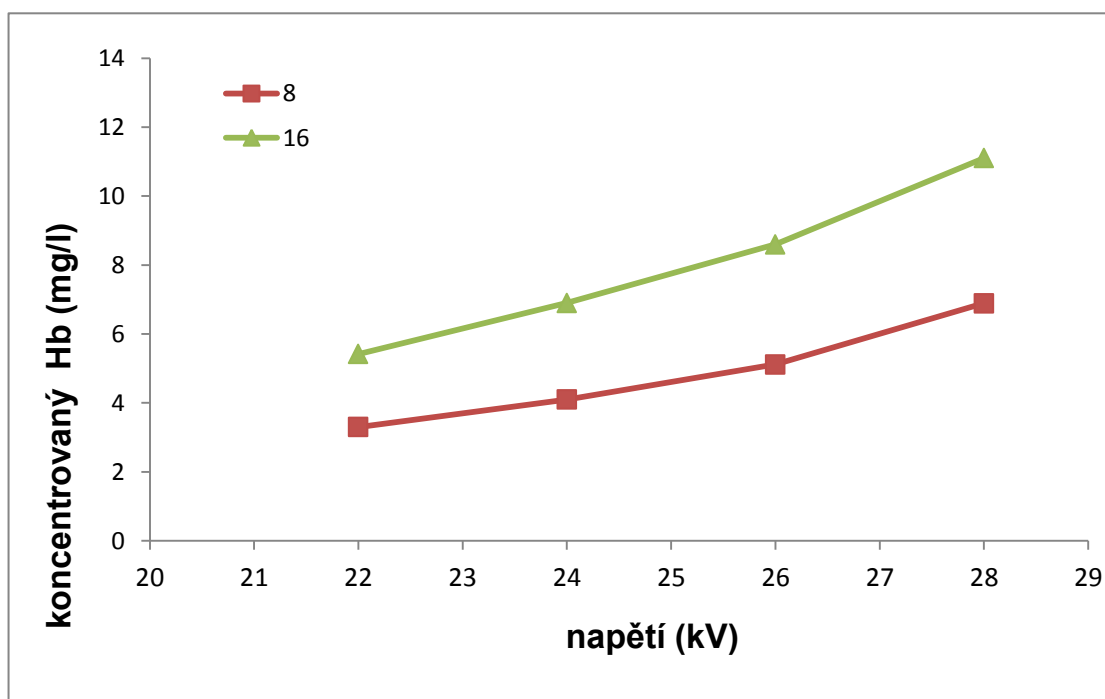
4. Experiment 4 ze dne 28.3.2011

Sledování hemolýzy v závislosti na napětí zdroje IRV

Také u tandemových rázových vln IRV dochází při zvyšujícím se napětí ke zvětšení účinku a poškození exponovaných erytrocytů. Čím větší je napětí a počet rázů, tím větší je biologický účinek rázové vlny.

Tabulka 4: Závislost hemolýzy erytrocytů (koncentrace hemoglobinu v mg/l) na počtu rázů IRV při různém napětí

napětí (kV)	počet rázů IRV	
	8	16
22	3,30	5,42
24	4,10	6,90
26	5,12	8,60
28	6,89	11,10



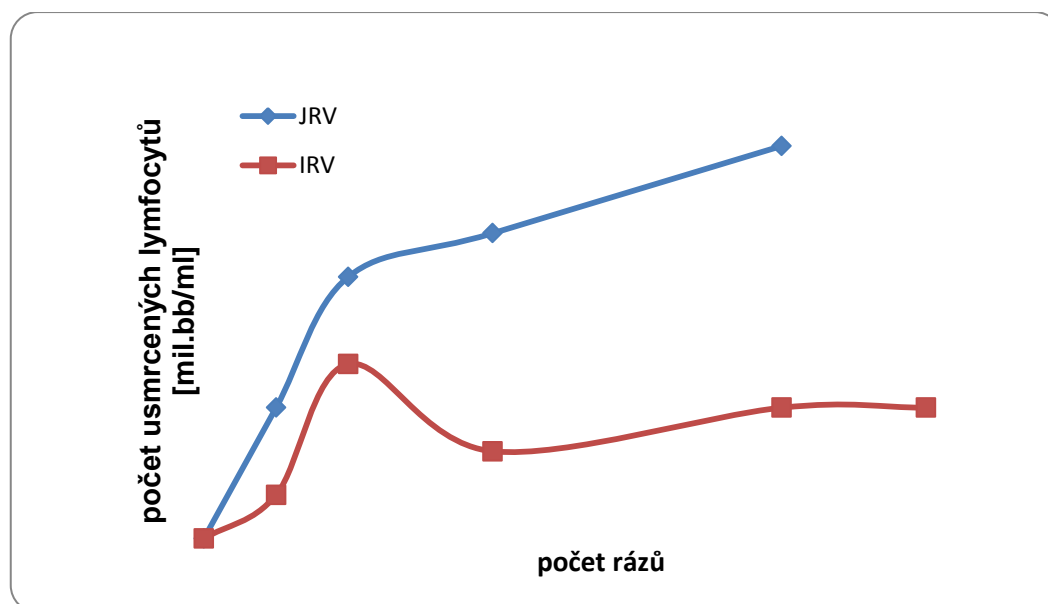
Graf 4: Závislost hemolýzy erytrocytů (mg/l) na počtu rázů IRV při různém napětí (kV)

5. Experiment 5 ze dne 17.5.2010

Sledování životnosti lymfocytů po exponování JRV a IRV

Tabulka 5: Závislost životnosti lymfocyt na počtu rázů JRV a IRV

		Počet přežitých	Počet usmrcených	
	počet rázů	mil.bb/ml	mil.bb/ml	životnost (%)
	0	1	0	96
JRV	60	0,7	0,3	95
JRV	120	0,4	0,6	94
JRV	240	0,3	0,7	94
JRV	480	0,1	0,9	89
	0	1	0	96
IRV	60	0,9	0,1	97
IRV	120	0,6	0,4	96
IRV	240	0,8	0,2	96
IRV	480	0,7	0,3	95
IRV	600	0,7	0,3	93



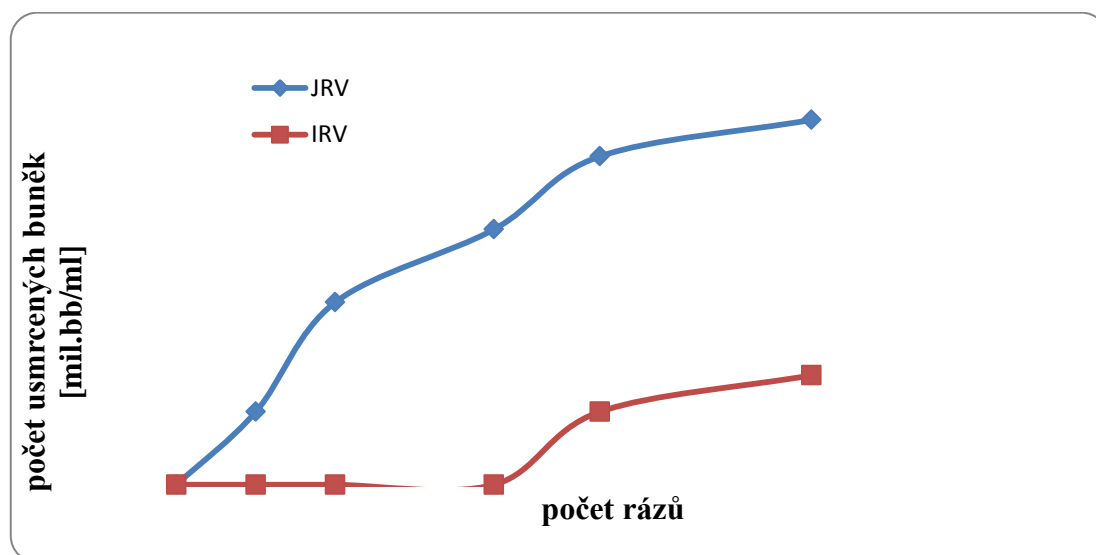
Graf 5: Závislost smrtelnosti lymfocytů na počtu rázů JRV a IRV

6. Experiment 6 ze dne 18.1.2011

Sledování životnosti buněk linie K-562 po exponování JRV a IRV

Tabulka 6: Závislost životnosti buněk K-562 na počtu rázů JRV a IRV

	počet rázů	počet přežitých	počet usmrcených	životnost (%)
		mil.bb/ml	mil.bb/ml	
	0	1	0	92
JRV	60	0,8	0,2	68
	120	0,5	0,5	53
	240	0,3	0,7	23
	320	0,1	0,9	13
	480	0	1	0
IRV	0	1	0	92
	60	1	0	79
	120	1	0	70
	240	1	0	61
	320	0,8	0,2	49
	480	0,7	0,3	43



Graf 6: Závislost smrtelnosti buněk K-562 na počtu rázů JRV a IRV

7 Diskuze

V této bakalářské práci je řešeno uplatnění rázové vlny v jednotlivých oblastech medicíny, též historie zdrojů vln a principy jejich generování. Popsán je vývoj litotryptoru, jehož použití je dnes rutinní záležitostí. Úspěšná destrukce ledvinových, močových či žlučových konkrementů se stala podnětem uvažování o možnostech aplikace rázových vln i v jiných odvětvích medicíny. Další metou se stal vývoj nového generátoru, který by rozšířil dosavadní úspěšné aplikování rázových vln na pevné konkrementy o schopnost interagovat na buněčné úrovni. Je jím mnohokanálový zdroj generující dvě po sobě jdoucí vlny, jehož mechanismus je podrobně popsán v teoretické části práce. Jeho vznik vedl realizaci uvedených experimentů.

Existují podmínky, za kterých se druhá vlna šíří do ohniska jako vlna zředění. Generuje mnohem víc kavitací, čímž řádově zesílí jejich účinek v ohnisku, ve kterém vzniklé složité tlakové pole s velkými tlakovými gradienty, na prostoru velkém řádově desítky mikrometrů, účinně rozbíjí buňku nebo krevní elementy. Cesta k využití v klinické praxi je však ještě dlouhá, protože způsob reakce není zcela jasný. Hodnotným poznatkem ale je, že prozatím nevíme o žádném uskálí ve fyzikálním principu.

Na Ústavu fyziky plazmatu byly provedeny zajímavé experimenty na tkáních prasat, kde byly tkáně exponovány do jedné hodiny po odběru a uchovány v izotonickém roztoku, proto aby nedocházelo ke změně akustických vlastností odebraných tkání určených k exponování. Tkáně jater, ledvin, svalů, kůží a sleziny byly ihned po expozici fixovány pro další histologické zpracování. Po exponování mnohokanálovým zdrojem bylo poškození tkáně patrné již makroskopicky. Provedená histologie prokázala poškození od buněčné alterace až po zcela hemorhagickou nekrózu příslušné tkáně. Obdobné pokusy byly provedeny i na litotryptoru, u kterého makroskopické poškození parenchymatózních tkání bylo klinicky bezvýznamné [14].

Nejinteresantnější a zároveň nejméně rozluštěnou oblastí zůstává využití rázových vln k léčbě nádorových tkání. Předpokladem úspěchu je jednak využití interagujících rázových vln, které vytváří množství kavitací a zvyšují tak toxicitu dvojrázů. Druhou

alternativou je výrazné zvýšení podtlaku v rázové vlně, který je pak při velkých amplitudách schopen vyvolat jejich destrukci. Má-li být dosaženo lokálního účinku rázové vlny v akusticky homogenním prostředí, pak je nutné využít efektu kavitací nebo vytvořit dvě po sobě následující rázové vlny tak, že první vlna vytvoří akustickou nehomogenitu, na níž se druhá vlna utlumí, jak popisují výše. Odlišnost akustických vlastností nádorové a zdravé tkáně je skutečně malá, proto všechny předchozí pokusy, využívající k testování vlivu na růst nádorových tkání komerčních generátorů rázových vln, byly neúspěšné. Známe nám prozatím efekt mírného zlepšení účinnosti cytostatik v kombinaci s rázovými vlnami. Pak by tandemové rázové vlny mohly být využity k sonodynamické terapii některých nádorových onemocnění [27].

V posledních letech se sází též na poškození nádorové tkáně teplotou. Zvýšení teploty v ohnisku však pořád není podrobně otestováno. Jedná se o speciální generátory, jejichž princip vychází z označení High Intensity Focused Ultrasound (HIFU). Podíl tepelných a netepelných účinků HIFU zůstává stále otázkou. Oblast onkologie bude ještě po nějakou dobu vývojovým oříškem.

Závěr

Uvedené experimenty byly realizovány v období od května roku 2010 do ledna 2011. V počátku projektu byly stanoveny cíle, jichž jsme dosáhli. Potvrzeny jsou již publikované výsledky o existenci zřetelné závislosti účinků rázové vlny a polohy exponovaného vzorku. Účinky vln rapidně klesají se vzdáleností od ohniska (tabulka a graf 2). Rozdíl v jejich efektivnosti v ohnisku a jeho okolí prokazuje, že poškození okolních tkání je zanedbatelné.

Poškození erytrocytů, tedy míra koncentrovaného uvolněného hemoglobinu, je přímo úměrná množství aplikovaných rázů (tabulky a grafy 1, 2) a je reprodukovatelná. Porovnáním hodnot při 160 a 320 rázech lze usuzovat, že při hodnotách vyšších než 160 rázů došlo již k totální hemolýze, tzn. saturaci uvolněného hemoglobinu v rozsahu 160 - 320 rázů. Biologický účinek roste s vyšším napětím (tabulky a grafy 3,4). Opět byl prokázán vyšší efekt IRV přímo v ohnisku, do kterého je energie rázové vlny koncentrována. Důkazem toho jsou i výsledky testování životnosti, respektive úmrtnosti, lymfocytů a buněk nádorové linie K-562. Při působení dvou po sobě jdoucích rázových vln IRV je efekt vyšší, než při aplikaci jednoduché rázové vlny JRV (tabulky a grafy 5, 6).

Spolupráce s fyziky akademie věd byla po dobu projektu mé bakalářské práce intenzivní, není u konce a je předpokladem pro pokračování výzkumu v oblasti interakce rázových vln s biologickými tkáněmi.

Seznam použité literatury

1. MORNSTEIN, V., et al. *Biologické účinky ultrazvuku - současný stav znalostí*. Sborník konference Pacient a ultrazvuk. Olomouc : [s.n.], 2003. 40 s.
2. THIEL, M. *Application of shock waves in medicine*. [s.l.] : Clin.Orthop., 2001. 18-21 s.
3. DVOŘÁČEK, J. *Urologie I.* [s.l.] : Praha, 1998. 146 s.
4. BENEŠ, J.: *Biologické účinky rázové vlny a biliární litotrypse*. Kandidátská dizertační práce., 1999.
5. *Historie a naše současnost* [online]. 2009 [cit. 2011-04-28]. Dostupné z WWW: <5. www:http://razovavlna.eu>.
6. BENEŠ, J., KORDAČ, V., ŠUNKA, P., JIRSA, M., MIREJOVSKÝ, P., ŠTUKA, C.: *Initial experimental findings on the disruption of gallstones using focused shock waves*. Cas Lek Cesk., 1986.
7. BENEŠ, J., ŠINDELKA, G., KORDAČ, V., SOUČEK, J., JIRSA, M., ŠUNKA, P.: *A simple model for verifying the effects of a focused shock wave from our generator on erythrocytes and lymphocytes*. Sb Lek., 1989.
8. BENEŠ, J., ŠUNKA, P., KORDAČ, V., JIRSA, M., ŠTUKA, C., MIREJOVSKÝ, P.: *Preclinical verification of possibilities of extracorporeal lithotripsy of gallstones in experimental animals*. Sb Lek., 1987.
9. KORDAČ, V., BENEŠ, J., ŠUNKA, P., ŠTUKA, C., CHMEL, J., KALÁB, M., MAREČEK, Z.: *Lithotripsy of gallstones using shock waves. First clinical experience in Czechoslovakia*. Cas Lek Cesk., 127, 1988.
1. MAY, T.C., KRAUSE, W.R., PRESLAR, A.J., SMITH, M.J., BEAUDOIN, A.J., CARDEA, J.A.: *Use of high-energy shock waves for bone cement removal*. J Arthroplasty. , 1990
2. BENEŠ, J., ŠUNKA, P., KAŠPAR, J., POUČKOVÁ, P. *Rázové vlny v lékařství, využití a nové možnosti*. IV. interní klinika a Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK, Praha, Ústav fyziky plazmatu AV ČR, Fakulta biomedicínského inženýrství ČVUT, Praha.
3. MORNSTEIN, V. *Ultrazvuk jako biofyzikální činitel*.

4. WILBERT, D.M., *A comparative review of extracorporeal shock wave generation*, Department of Urology, University of Tuebingen Medical School, Tuebingen, Germany.
5. DIBDIÁK, L. Působení interagujících rázových vln na tkáň. Bakalářská práce. Praha, 2008.
6. BENEŠ, J., ŠUNKA, P., HANI, A.B.: Effect on hemolysis by shock waves created by a new method of multichannel discharge. *Sb Lek.*, 102, 2003
7. RAJMON, P. *Co nového v léčbě urolitiázy*, Urologická klinika FN Olomouc Interní medicína – mezioborové přehledy 2003, str. 4, 5.
8. ŠUNKA, P. Impulsní elektrické výboje ve vodě a jejich využití v ekologii a medicíně aneb kam až sahá čtvrté skupenství hmoty, Ústav fyziky plazmatu AV ČR.
9. MARBERGER M, TUERK C, STEINKOGLER I. *Painless piezoelectric extracorporeal lithotripsy.*, *J Urol*, 139, 1988.
10. WILBERT DM, REICHENBERGER H, NOSKE E, HOHENFELLNER R. *New generation shock wave lithotripsy.* *J Urol* 1987; 138: 563–5
11. BENEŠ, J., ŠUNKA, P., KAŠPAR, J. POUČKOVÁ, P. Rázové vlny v lékařství, využití a nové možnosti.
12. ROSYPAL, S. *Nový přehled biologie*. Praha : Scientia, 2003. 797 s.
13. SILBERNAGEL, S. *Atlas fyziologie člověka*. [s.l.] : Grada, 2004. 448 s.
14. CYRIL, A., KEELE, NEIL, E. *Klinická fyziologie*, Avicenum, 1970.
15. TROJAN, S. *Fyziologie*, Avicenum, 1988.
16. TROJAN, S. et al. *Fyziologie pro lékařské fakulty*. Státní pedagogické nakladatelství Praha, 1986.
17. SCHREIBER, M. *Funkční somatologie*, H&H, 1998.
18. ŠUNKA, P. Prezentace k patentovému spisu.

Seznam použitých obrázků

- Obr. 1. [BENEŠ, J.: *Biologické účinky rázové vlny a biliární litotrypse*. Kandidátská dizertační práce., 1999.]
- Obr. 2. [<http://www.zdn.cz>]
- Obr. 3. [DIBDIÁK, L. *Působení interagujících rázových vln na tkáň*. Bakalářská práce. Praha, 2008.]
- Obr. 4., 5., 6. [BENEŠ, J., ŠUNKA, P., KAŠPAR, J., POUČKOVÁ, P. *Rázové vlny v lékařství, využití a nové možnosti*. IV. interní klinika a Ústav biofyziky a informatiky 1. LF UK, Praha, Ústav fyziky plazmatu AV ČR, Fakulta biomedicínského inženýrství ČVUT, Praha]
- Obr. 9. [<http://www.accessmedicine.ca>]
- Obr. 12. [ŠUNKA, P. *Prezentace k patentovému spisu*.]